

5

Anmelder:

Proteros Biostructures GmbH  
Am Klopferspitz 9  
München

10

15

**VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUM BEHANDELN EINES KRISTALLS  
DURCH AUFBRINGEN VON MIKROTROPFEN AUF DEN KRISTAL**

20

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Behandeln eines Kristalls mit einer Flüssigkeit und insbesondere auf eine Vorrichtung und ein Verfahren zum Einbringen von Liganden und/oder Inhibitoren in eine Proteinkristallstruktur.

25

In der Proteinkristallographie kommt es häufig vor, daß vor der kristallographischen Messung Liganden oder Inhibitoren in eine Proteinstruktur bzw. einen Proteinkristall eingebracht werden sollen. Ziel ist es dabei, die kristallographische Struktur eines Proteins ohne und mit Ligand oder Inhibitor zu vergleichen und die räumliche Anordnung des Liganden oder Proteins zu ermitteln. Liganden können hierbei alle an eine Protein oder Polypeptid bindenden Moleküle oder Substanzen sein, die bspw. inhibitorische Wirkung oder auch agonistische Wirkung auf die Funktion des Proteins haben können. Ggf. können Liganden organisch-chemische Moleküle sein oder auch (modifizierte) Antikörper oder Antikörperfragmente, native Bindungspartner oder Fragmente, ggf. modifiziert, vom kristallisierten Protein. Weiterhin werden regelmäßig auch Schwermetallatom-Derivate in der Kristallographie benötigt, um die entsprechende Phaseninformationen zu erhalten. Ein Ligand i.S. der vorliegenden Erfindung kann daher auch ein an das kristallisierte Protein bindendes Schwermetallatom(salz)

30

35

Ein im Stand der Technik bekanntes Verfahren zum Einbringen von Liganden, bspw. Inhibitoren, ist das sogenannte „Soaking“ mit einem Puffer, der aus der Kristallisationslösung sowie dem Liganden besteht. Falls ein in den Kristall zu „soakender“ Ligand schlecht oder nur schwerlöslich sind, können dem Puffer zur Erhöhung der Löslichkeit desselben weitere Substanzen als Löslichkeitsverbesserer zugesetzt werden. Beispielsweise kann es sich um Lösungsmittel wie DMSO (Dimethylsulfoxid), TFE, Ethanol, 2-Nitropropan oder andere organische Lösungsmittel, insbesondere chlorierte Lösungsmittel, ggf. auch Emulgatoren handeln.

- 10 Das „Soaking“-Verfahren besitzt verschiedene Nachteile. So besteht ein Nachteil darin, daß die Kristalle beim „Soaking“ einer anderen Umgebung ausgesetzt werden müssen, wodurch der Kristall Schaden erleiden kann, d.h. insbesondere, dass die Mikrostruktur des Kristalls nach dem „Soaking“ Unregelmäßigkeiten aufweist, die das Diffraktionsvermögen des Kristalls beeinträchtigen. Sollen z.B. schwerlösliche Inhibitoren oder Liganden in die Proteinkristallstruktur eingebracht werden, so benötigt man sehr hohe Konzentrationen an Lösungsmittel. Gerade hohe Lösungsmittelkonzentrationen führen aber häufig zur Zerstörung der fragilen Proteinkristalle, wie zuvor erwähnt.

- 20 Darüber hinaus besteht ein weiterer Nachteil des herkömmlichen „Soaking“-Verfahrens in dem hohen Zeitaufwand des Verfahrens. Dieser ist zum einen durch die unter Umständen zahlreichen (repetitiven) „Soaking“-Prozesse bedingt, die, ggf. unter Veränderung der Konzentrationsverhältnisse des zu „soakenden“ Liganden durchlaufen werden müssen, um überhaupt eine geeignete, die Liganden oder Inhibitoren enthaltende, also komplexierte Proteinkristallstruktur (Cokristall) zu erhalten, und zum anderen dadurch, daß bereits ein einzelner Soaking-Prozeß bereits sehr zeitaufwendig sein kann, da bspw. die Diffusionskinetik beachtet werden muß.

- 30 Ein weiterer Nachteil des „Soaking“-Verfahrens besteht darin, daß röntgenkristallographische Untersuchungen oder Untersuchungen des Proteinkristalls mit Synchrotronstrahlung während des „Soaking“-Verfahrens technisch nicht möglich sind.

Die Aufgabe der Erfindung besteht nun darin, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Behandlung eines Kristalls mit einer Substanz zu schaffen, die im Vergleich zu bisherigen Vorrichtungen und Verfahren unter anderem eine schonendere Behandlung von Kristallen und insbesondere Proteinkristallen und die einfachere und/oder effizientere Herstellung von komplexierten Kristallen und insbesondere Proteinkristallen sowie die einfache Herstellung von bisher nur schwer oder überhaupt nicht herstellbaren komplexierten Kristallen und insbesondere Proteinkristallen erlauben.

Diese Aufgabe wird durch eine Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls mit einer Flüssigkeit mit einer Halterung zur Befestigung des Kristalls und einem Mikrodosiersystem gelöst, das im Verhältnis zur Halterung so angeordnet ist, daß damit Mikro-Tropfen einer Flüssigkeit, die bspw. Lösungsmittel und mindestens einen Ligandentyp aufweist, auf den in der Halterung befestigten Kristall aufgebracht werden können.

Durch das Auftropfen von Mikro-Tropfen mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung läßt sich eine wesentlich schonendere Behandlung von Kristallen und insbesondere Proteinkristallen mit bestimmten aufzubringenden Substanzen, die in einer Lösung enthalten sind, erreichen. Diese Substanzen können bei Proteinkristallen Liganden, bspw. Inhibitoren, Substrate oder Reaktanden, sein. Bei den Liganden wird es sich bei Proteinkristallen typischerweise um Agonisten, Substrate oder Antagonisten der kristallisierten Proteine handeln. Weiterhin wird erfindungsgemäß erstmals ein System zur Verfügung gestellt, das es erlaubt, einen Kristall, insbesondere einen Proteinkristall, unabhängig von der Umgebung in einer Mutterlösung, wie in allen Experimenten nach dem Stand der Technik, mit einem Liganden zu komplexieren. Auf diese erfindungsgemäße Weise können Proteinkristalle auch in solchen Fällen, die mit den Verfahren nach dem Stand der Technik nicht mit Liganden komplexierbar sind, dennoch eine Komplexbildung eingehen. Die Ursache für die Überlegenheit des erfindungsgemäßen Verfahrens, das einen frei montierten Kristall und die Bereitstellung eines Mikro(Piko)tropfens durch Verwendung einer entsprechenden Vorrichtung voraussetzt, ist die Verschiebung des Gleichgewichts der Reaktion zwischen Ligand und kristallisiertem Protein zum komplexierten Protein. Dies wiederum hängt mit der Reduktion der apparenten Dissoziationskonstante  $K_D$  zusammen, da die Konzentration der freien Komponenten durch die Isolation der Proteinkristalls von der den Kristall (nach dem Stand der Technik) umgebenden Mutterlauge erheb-

lich eingeschränkt ist. Diese Reduktion der  $K_D$  erlaubt es auch dann Komplexe zu erhalten, wenn die Bindungskonstante des Liganden an das kristallisierte Protein eigentlich gering ist oder der Ligand nur schwach löslich ist und daher Verfahren nach dem Stand der Technik (Kristall in Mutterlösung) keine oder nur eine geringfügige Komplexierung (die für röntgenkristallographische Folgeexperimente nicht ausreichend ist) ergeben.

Darüber hinaus ist es von erheblicher Bedeutung, bei der Komplexbildung nicht nur die erfindungsgemäß vorteilhafte Verschiebung des Gleichgewichts der Komplexierungsreaktion zu betrachten, sondern auch die durch das erfindungsgemäße System mit frei montiertem Kristall vorteilhafte Kinetik der Komplexbildung, insbesondere bei schwach löslichen Liganden. Der erfindungsgemäß frei montierte Kristall (ohne die Umgebung einer Mutterlösung) hat eine größere Stabilität als der in der Mutterlösung nach dem Stand der Technik „gesoakte“ Proteinkristall. Diese größere Stabilität kann genutzt werden, um bspw. die Komplexierung des Liganden, mit dem besonders bevorzugten Ziel mindestens 90%iger, vorzugsweise mindestens 95%iger Absättigung der im Kristall für den Liganden enthaltenen Bindungsplätze, durch die Verwendung von Verfahren zu erzwingen, denen ein Proteinkristall im Falle des „Soakings“ oder der Kokristallisation nach dem Stand der Technik nicht zugänglich wären. Insbesondere vorteilhaft in diesem kinetischen Zusammenhang ist die Verwendung von auf Temperaturen oberhalb von 20°C erwärmter Ligandenlösung, die als Pikotropfen auf den frei montierten Kristall aufgetragen wird. Diese Erwärmung kann bspw. mindestens 30°C, vorzugsweise mindestens 40°C, noch stärker bevorzugt mindestens 50°C betragen. Auch eine Erwärmung bis zu 75°C ist möglich. Darüber hinaus oder in Kombination mit der Erwärmung der Ligandenlösung kann diese auf den Kristall, bspw. direkt aufgespritzte, als Pikotropfen aufgetragene Ligandenlösung auch organische Lösungsmittel enthalten oder aus diesen bestehen. Sofern das organische Lösungsmittel mit Wasser löslich ist (bspw. DMSO oder TFE) kann dieses zu mindestens 20 Vol.-%, vorzugsweise zu mindestens 40 Vol.-% und noch stärker bevorzugt zu mindestens 50 Vol.-% in einem Wasser/organisches Lösungsmittel-Gemisch enthalten sein. Auch kann der Ligand in einem reinen organischen Lösungsmittel oder in einem Gemisch verschiedener organischer Lösungsmittel gelöst und als Mikrotropfen auf den frei montierten Kristall (siehe hierzu im folgenden) aufgetragen werden. Der Einsatz organischer Lösungsmittel, der wiederum nur durch die erfindungsgemäße Verwendung eines frei montierten Kristalls und eines Mikrotropfens möglich wird, ist insbesondere dann bevor-

zugt, wenn die Liganden in wässriger Lösung nur schwer oder unlöslich sind. Schließlich kann der frei montierte Kristall auch einem Verdampferstrom ausgesetzt sein, wobei über einen Verdampfer organisches Lösungsmittel oder ein organische Lösungsmittelgemisch verdampft wird. Auf diese Weise wird das organische Lösungsmittel, bspw. DMSO oder Chlorkohlenwasserstoff, auf/im Kristall angereichert und dadurch die Löslichkeit des in Wasser schwer löslichen Liganden erhöht.

Gemäß einer besonders vorteilhaften Ausgestaltung ist bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls mit mindestens einer Substanz die Kristallhalterung so ausgebildet, daß durch die Halterung ein Gasstrom geführt werden kann, der auf den in der Halterung befestigten Kristall gerichtet ist. Dadurch kann der Kristall während der Behandlung durch die Mikro-Tropfen in einer definierten Umgebung gehalten werden.

Falls es sich bei dem Kristall um einen Proteinkristall handelt und die Substanz in der aufzutropfenden Flüssigkeit aus gelösten Liganden, bspw. Inhibitoren, besteht, die in die Kristallstruktur des Proteinkristalls eingebracht werden sollen, so kann dem Gasstrom auch gemäß einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform ein Lösungsvermittler (s. obige Ausführungen) beigemischt werden, der insbesondere bei schwerlöslichen Liganden die Diffusion durch den Proteinkristall bzw. die Bindung an die kristallisierten Proteine wesentlich erleichtern kann.

Es ist ferner besonders vorteilhaft, daß die erfindungsgemäße Vorrichtung auch auf einem Goniometerkopf im Röntgenstrahl oder in einem Synchrotron befestigt werden kann, so daß der zeitliche Ablauf der Veränderung der kristallisierten Proteinstruktur, z.B. infolge der Ligandenbindung während des Auftropfens der Mikro-Tropfen, im Meßgerät beobachtet werden kann.

Die Aufgabe der Erfindung wird ferner durch ein Verfahren zum Behandeln eines Kristalls mit einer Flüssigkeit gelöst, bei dem der Kristall befestigt wird und bei dem dann Mikro-Tropfen der Flüssigkeit, enthaltend eine Lösung und mindestens Liganden einer Art, auf den Kristall aufgebracht werden.

Weitere vorteilhafte Ausführungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des erfindungsgemäßen Verfahrens ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden nachfolgend unter Bezug auf die beiliegende Zeichnung näher erläutert. Es zeigen

Fig. 1 eine teilweise im Schnitt dargestellte Ansicht einer Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls mit einer Lösung,

10 Fig. 2 ein Gehäuse eines Steuergeräts zur Steuerung eines bei einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendeten Mikrodosiersystems,

Fig. 3 zeigt ein Flüssigkeitszufuhrsystem für ein Mikrodosiersystem, das bei einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendet werden kann.

15 Die Erfindung wird im folgenden am Beispiel der Behandlung von Proteinkristallen beschrieben, sie kann aber auch in analoger Weise bei der Behandlung von anderen Kristallen eingesetzt werden.

20 Fig. 1 zeigt eine erste Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls. Dabei ist links in der Fig. 1 eine Halterung 1 dargestellt, die dazu dient, einen Proteinkristall 2 zu befestigen. Die in der Fig. 1 dargestellte Halterung, die in ihrer generischen Art auch als „free mounting system“ (frei montiert) bezeichnet wird, ist bereits aus dem Stand der Technik bekannt und z.B. in der Deutschen Patentschrift DE 198 42 797 C1  
25 beschrieben worden. Diese Druckschrift wird insoweit vollumfänglich in die Offenbarung der vorliegenden Anmeldung einbezogen. Im Sinne der vorliegenden Anmeldung ist ein frei montierter Kristall ein Kristall, der sich nicht in einer Flüssigkeit befindet, wie es etwa nach dem im Stand der Technik bekannten „Soaking“ üblich ist.

30 Die Halterung 1, die in der Fig. 1 in einer Schnittansicht von der Seite dargestellt ist, besteht im wesentlichen aus einem Trägerblock 3, der ein einschiebbares Einsatzteil 4 aufweist, das in eine Öffnung des Trägerblocks 3 eingeschoben werden kann. Am Einsatzteil ist eine Halte-

kapillare 5 angebracht, an deren freiem Auflageende der Proteinkristall 2 gehalten wird. Die Haltekapillare besteht vorzugsweise aus einer Mikropipette, in der über eine in der Fig. 1 nicht dargestellte und mit dem anderen Ende der Mikropipette verbundene Pumpvorrichtung ein Unterdruck erzeugt wird, der dazu dient, den Proteinkristall 2 an dem freien Auflageende zu halten. Das linke Ende 8 des Einsatzteils ist so ausgebildet, daß daran die Halterung 1 an einem Goniometerkopf einer Röntgen- oder Synchrotronbestrahlungsanlage befestigt werden kann.

In einer Röntgen- oder Synchrotronbestrahlungsanlage kann die Beugung von Röntgenstrahlen beim Durchgang durch das Kristallgitter des Proteinkristalls ausgenutzt werden, um aus dem Beugungsbild auf die räumliche Anordnung der Atome und Moleküle in dem kristallisierten Protein zu schließen bzw. die Struktur durch mathematische Operationen zu errechnen. Die erforderlichen Röntgenstrahlen können z.B. durch Beschuß von Kupfer oder anderen Materialien mit Elektronen erzeugt werden (bspw.  $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung). Alternativ kann die Röntgenstrahlung auch in einem Synchrotron, d.h. einem Teilchenbeschleuniger, erzeugt werden, bei dem die Röntgenstrahlung von auf Kreisbahnen beschleunigten Elektronen emittiert wird. Das Synchrotron besitzt trotz des größeren apparativen Aufwands eine Reihe von Vorteilen gegenüber der herkömmlichen Erzeugung von Röntgenstrahlung durch Elektronenbeschuß von Metallen. So besitzen die durch Synchrotrone erzeugten Röntgenstrahlen eine höhere Intensität und können in verschiedenen Wellenlängen gewählt werden. Auch besteht auf diese Weise die Möglichkeit, „weißes“ Röntgenlicht einzusetzen und damit den Kristall mit Röntgenblitzen, die Röntgenstrahlen aller Wellenlängen aufweisen, zu beschießen. Darüber hinaus lassen sich die Messungen mit dem Synchrotron wesentlich schneller als mit herkömmlichen Röntgenbestrahlungsanlagen durchführen.

25

In die Halterung 1 ist ferner ein Gaskanal 6 integriert, dessen Mündungsende 7 auf das freie Auflageende der Haltekapillare 5 gerichtet ist, an dem der Proteinkristall 2 befestigt ist. Dabei wird der am Auflageende angebrachte Proteinkristall 2 vollständig vom Gasstrom aus dem Gaskanal 6 umschlossen, so daß eine definierte Gasatmosphäre um den Proteinkristall herum erzeugt werden kann. Der Gaskanal 6 ist an seinem in der Fig. 1 als offen dargestellten Ende mit einem Gaserzeugungsmittel und einem Gasmischmittel verbunden, mit dem die Zusammensetzung des Gasstroms variabel eingestellt werden kann. Falls das um den Proteinkristall

30

herum befindliche Gas Luft ist, kann das Gasmischmittel z.B. dazu dienen, die Luftfeuchtigkeit auf einen vorherbestimmten optimalen Wert einzuregeln. Es kann darüber hinaus auch ein Temperatureinstellmittel vorgesehen sein, mit dem die Temperatur des Gasstroms gemessen und auf einen bestimmten vorgebbaren Wert eingeregelt werden kann. Auch können andere gasförmige Substanzen dem Gasstrom beigemischt werden, so dass bspw. der Stickstoff- oder Sauerstoffgehalt der Luft modifiziert, bspw. erhöht, werden kann.

In der Deutschen Patentanmeldung Nr. 10232172.8-52 mit dem Titel „Vorrichtung und Verfahren zur Erzeugung einer definierten Umgebung für partikelförmige Proben“ ist bereits eine Vorrichtung und ein Verfahren beschrieben, mit dem sich eine hochgenaue und langzeitstabile Feuchteinstellung eines durch die oben beschriebene Halterung geführten feuchten Gasstroms am Ort des partikelförmigen Kristalls erreichen läßt. Diese Druckschrift wird daher insoweit ebenfalls vollumfänglich in die Offenbarung der vorliegenden Anmeldung einbezogen.

Über dem Kristall ist ein Mikroskop mit Videosystem 10 angebracht, mit dem der Proteinkristall während der Behandlung mit der Substanz beobachtet werden kann. Ggf. kann infolge der Beobachtung über das Videosystem der Behandlungsmodus modifiziert oder auch die Behandlung eingestellt werden.

Die in der Fig. 1 dargestellte erfindungsgemäße Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls mit einer Substanz umfaßt darüber hinaus ein Mikrodosiersystem 11, das rechts in der Fig. 1 in einer Seitenansicht im Schnitt dargestellt ist.

Das Mikrodosiersystem 11 umfaßt eine sogenannte Piezopipette 12, die in einem Stativ 15 gehalten wird und so auf den Proteinkristall 2 ausgerichtet ist, daß dieser mittels der Piezopipette mit Tropfen beschossen werden kann. Die Piezopipette ist in der Fig. 1 aus Gründen der Anschaulichkeit in einem vergrößerten Maßstab im Verhältnis zur Halterung 1 dargestellt. Die Piezopipette ist so angeordnet, daß die Spitze der Piezopipette einen Abstand von typischerweise 3 mm zu dem Proteinkristall aufweist. Vorzugsweise liegt dieser Abstand in einem Bereich von 1 – 5 mm, kann jedoch unter besonderen Umständen auch größer oder kleiner gewählt werden.



Die Piezopipette 12 besteht aus einer Glaskapillare 13, die z.B. aus Borosilicatglas bestehen kann. Die Durchmesser der Öffnung der Glaskapillare ist einer der Faktoren, die die Größe der von der Piezopipette abgegebenen Mikro-Tropfen beeinflussen und kann z.B. in einem Bereich zwischen 5 und 50 Mikrometer liegen. Die Glaskapillare 13 ist von einem piezoelektrischen Element 14 umschlossen, das aus einem Material besteht, das einen piezoelektrischen Effekt zeigt. Es kann sich bei diesem Material z.B. um einen Piezokristall handeln. Das piezoelektrische Element 14 ist darüber hinaus über zwei Kabel 16 mit einem Steuergerät 17 elektrisch verbunden, mit dem eine Spannung an das piezoelektrische Element 14 angelegt werden kann. Wird ein Spannungspuls durch das Steuergerät 17 an das piezoelektrische Element 14 angelegt, so wird das piezoelektrische Element 14 und mit diesem auch die Glaskapillare 13 kontrahiert und ein Tropfen aus der Öffnung der Piezopipette herausgeschossen. Über das Steuergerät 17 können unterschiedlich geformte Spannungspulse an die Piezopipette angelegt werden können, deren Formen die Form und Größe der Mikro-Tropfen und deren Frequenz die Frequenz der Mikro-Tropfen beeinflussen.

In der Fig. 2 ist ein Gehäuse eines möglichen Steuergeräts zur Steuerung der Piezopipette dargestellt, wobei die einzelnen Steuerungsmöglichkeiten anhand der in der Fig. 2 dargestellten Schalter und Steuerelemente des Steuergeräts erläutert werden sollen. Das Steuergerät weist zunächst drei verschiedene LCD-Anzeigen 20, 21 und 22 auf. Auf der ersten LCD-Anzeige 20 wird der aktuelle Wert für den Spannungspegel der Impulsausgangsspannung für das Piezopipettensteuersignal angezeigt. Dieser Wert läßt sich über einen Drehregler 23 variabel einstellen. Auch die Impulsweite des Pipettenansteuersignals, die auf der zweiten LCD-Anzeige 21 in Mikrosekunden angezeigt wird, läßt sich mittels eines zweiten Drehreglers 24 einstellen. Schließlich ist ein dritter Drehregler 25 vorgesehen, um die Frequenz der an die Piezopipette angelegten Spannungsimpulse einzustellen, die auf der dritten LCD-Anzeige 22 angezeigt wird. Diese Frequenz, die bis zu einige kHz betragen kann (z.B. 2 kHz) entspricht der Frequenz, mit der die Mikro-Tropfen aus der Piezopipette auf den Kristall geschleudert werden. Der Einstellbereich der Frequenz kann z.B. in einem Bereich zwischen 1 Hz und 6 kHz liegen. Die Höhe der Impulsausgangsspannung und die Weite der Spannungsimpulse müssen zunächst so eingestellt werden, daß es überhaupt zu einer Tropfenerzeugung mit der Piezopipette kommt. Darauf wird die Frequenz gewählt, die für den jeweiligen Kristallbe-

handlungsprozeß ideal ist. Die Frequenz kann natürlich auch während des Kristallbehandlungsprozesses laufend variiert werden.

Das Steuergerät weist ferner zwei Eingänge 26 auf, an denen die beiden Verbindungskabel  
5 der Piezopipette angeschlossen werden. Ferner sind ein Netzkabel 27 sowie ein Netzanschluß  
28 zur Stromversorgung des Steuergeräts vorgesehen. Über den weiteren Signaleingang 29  
können von anderen elektrischen Geräten vorgegebene Spannungsimpulsfolgen angelegt  
werden, um die Mikro-Tropfenerzeugung auszulösen und die Mikro-Tropfenfolge und -form  
von außen zu steuern. Das kann z.B. sinnvoll sein, wenn es ein zentrales Steuergerät gibt, das  
10 sowohl die Tropfenerzeugung als auch andere Parameter der Kristallbehandlung wie den über  
die Kristallhalterung zugeführten Gasstrom, die Zusammensetzung des Gasstroms (z.B. seinen  
Feuchtegehalt), die Temperatur des Gasstroms, eine angeschlossene Röntgenbestrahlungs-  
anlage etc. steuert und die verschiedenen Steuerungsparameter in einer vorherbestimm-  
ten Weise zueinander synchronisiert.

15 Der Schalter 30 ist dazu vorgesehen, den Piezopipettenbetrieb ein- und auszuschalten. Über  
den weiteren Schalter 31 kann zwischen Einzelspannungsimpulsbetrieb und kontinuierlichem  
Spannungsimpulsbetrieb umgeschaltet werden, d.h. zwischen Einzeltropfenerzeugung und  
kontinuierlicher Tropfenerzeugung. Für die Einzeltropfenerzeugung kann ferner ein Taster  
20 32 vorgesehen sein, über den einzelne Spannungsimpulse an die Piezopipette angelegt werden  
können, wenn es gewünscht ist, einzelne Tropfen per Handbetrieb auf den Kristall zu schie-  
ßen.

Der Schalter 33 dient schließlich dazu zwischen verschiedenen Impulsformen der an die Pie-  
25 zopipette 12 angelegten Spannungsimpulse variieren zu können. In der Schalterstellung A  
kann z.B. ein vorgegebener Standard-Rechteckspannungsimpuls mit vorherbestimmter Dauer  
und Höhe erzeugt werden, während in der Schalterstellung B ein Rechteckspannungsimpuls  
erzeugt werden kann, dessen Dauer und Höhe variabel eingestellt werden kann. Es ist natür-  
lich bei anderen Ausführungen auch denkbar, daß Spannungsimpulse angelegt werden, die  
30 von der Rechteckform abweichen. Die Impulsform der Spannungsimpulse wird nun so ge-  
wählt, daß eine optimale Tropfenerzeugung in Hinblick auf den zu behandelnden Kristall  
gewährleistet ist.

Verschiedene Größen der Mikro-Tropfen, die z.B. für verschiedene Kristallgrößen geeignet sein können, können über die Variation der Spannungspulsweiten und Spannungspulshöhen eingestellt werden, die die an die Piezopipette angelegten Spannungen aufweisen.

5

Die Glaskapillare 13 der Piezopipette 12 ist typischerweise über eine Zuleitung 18 mit einem in der Figur 1 nicht dargestellten Vorratsgefäß verbunden, das die Lösung enthält, die auf den Proteinkristall getropft werden soll. Diese Lösung enthält die Substanz oder die Substanzen, mit der bzw. denen der Proteinkristall behandelt werden soll. Die Oberkante des Flüssigkeitsspiegels der sich im Vorratsgefäß befindenden Flüssigkeit sollte dabei etwas höher als die Unterseite der Pipettendüse eingestellt werden. Alternativ dazu kann die Flüssigkeit bei einer Ausführungsform ohne Vorratsgefäß aber auch direkt über die Auslaßöffnung der Piezopipette in die Piezopipette gesaugt werden, um sie dann später wieder abgeben zu können. Es kann auch eine Temperiertvorrichtung um das Vorratsgefäß herum angeordnet sein, um die in dem Vorratsgefäß sich befindende Flüssigkeit auf eine gewünschte Temperatur zu bringen. Gemäß einer Ausführungsform kann vor dem Aufbringen der Lösung auf den Kristall der pH-Wert und/oder die Ionenstärke (bzw. spezifische Salzkonzentrationen) der Lösung gemäß den im Stand der Technik bekannten Verfahren auf einen gewünschten Wert eingestellt werden.

20

Unter Mikro-Tropfen im Sinne der vorliegenden Erfindung sollen Tropfen zu verstehen sein, deren Volumen kleiner als 1 nl ist, wobei das Volumen der Mikro-Tropfen vorzugsweise zwischen 1 nl (nanoliter) und 1 pl (picoliter), noch weiter bevorzugt zwischen 100 pl und 20 pl und noch stärker bevorzugt zwischen 20 pl und 4 pl liegt. Aus diesen Größen lassen sich über die Volumensformel die entsprechenden geeigneten Durchmesser der Tropfen errechnen, wenn man näherungsweise davon ausgeht, daß die Tropfen kugelförmig sind. Die gewünschte Tropfengröße kann erfindungsgemäß eingestellt werden.

25

Die Mikro-Tropfen der auf den Kristall aufzubringenden Flüssigkeit sind dabei vorzugsweise kleiner als das Volumen des Kristalls ist. Ein typisches Kristallvolumen kann dabei z.B. in einer Größenordnung von 1 nl liegen.

30

Das Volumen der im speziellen Fall verwendeten Mikro-Tropfen wird in Abhängigkeit vom Volumen des Kristalls gewählt. Dabei betragen die Volumen der Mikrotropfen weniger als 50 %, z.B. 1 bis 20 %, des Kristallvolumens und vorzugsweise von 1, stärker bevorzugt von 5 bis 10 % des Kristallvolumens.

5

Die Tropfenerzeugung mittels einer Piezopipette ist nur ein Beispiel für eine Mikrodosiervorrichtung. Es können auch andere Vorrichtungen verwendet werden, die in der Lage sind, Mikro-Tropfen zu erzeugen.

- 10 So kann z.B. auch ein Mikrodosiersystem verwendet werden, das eine Kapillare und ein in der Kapillare angeordnetes Mikroventil umfaßt. Dabei wird die Flüssigkeit unter Druck aus einem Vorratsgefäß auf das Mikroventil gepreßt, das von einem Steuergerät elektrisch innerhalb eines kurzen Zeitintervalls geöffnet und danach wieder geschlossen wird, um die Tropfen zu erzeugen. Die Begrenzung der Tropfengröße ergibt sich hier durch die noch steuerbare Öff-
- 15 nungsdauer des Ventils.

- Als Mikrodosiersystem kann bei einer anderen Ausführungsform auch ein Zerstäuber dienen. Ein Zerstäuber hat allerdings gegenüber den oben beschriebenen Lösungen den Nachteil, daß das Ausrichten der Tropfen auf den Kristall schwieriger ist. Daher wird vorteilhafter Weise
- 20 dem Zerstäuber ein Mittel nachgeordnet, das die Orientierung der aus dem Zerstäuber erhaltenen Mikro-Tropfen auf den Kristall sicherstellt.

- Es ist gemäß einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung auch denkbar, daß die Mikrodosier-Vorrichtung aus einem „Loop“, bspw. einer Schlaufe, besteht,
- 25 mit dem einzelne Tropfen (oder nur ein Tropfen) auf den Kristall durch bspw. Abschütteln oder Abtropfenlassen von dem „Loop“ aufgebracht werden. Es muß allerdings bei dieser Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe sichergestellt sein, daß die aufgebrachten Tropfen-volumina klein genug für die Proteinkristalle (im Sinn der voranstehend offenbarten Volumenverhältnisse von Kristall zu Tropfen) sind.

30

Auch alle weiteren technischen Möglichkeiten, Mikro-Tropfen entsprechender Größe zu erzeugen, sind Lösungen im Sinne der vorliegenden Erfindung.

Um die Frequenz der Auftragung der Mikrotropfen auf den Kristall variieren zu können, kann zwischen der Vorrichtung zur Tropfenerzeugung und dem Kristall eine Lochplatte, die bspw. mit einer gewissen Frequenz rotiert, angeordnet sein. Da – abhängig von der Vorrichtung zur Tropfenerzeugung – die Bereitstellung kleiner Mikrotropfen häufig eine höhere  
5 Tropfenfrequenz erforderlich macht, kann über die Zwischenschaltung einer Lochplatte, die nur jeden 2., 3. oder 4. oder weniger Tropfen auf den Kristall passieren lässt. Auch das auf den Kristall aufgetragene Volumen gesteuert werden.

Bei einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Proteinkristall zunächst an dem freien Auflagenende der Haltekapillare 2 befestigt. Anstelle der Haltekapillare 2 kann auch ein sogenannter „Loop“, also eine Art Schlaufe, verwendet werden, in dem der Proteinkristall befestigt ist. Der Proteinkristall ist dabei frei von jeglicher Oberflächenlösung und damit zugänglich für Lösungen, die von außen direkt mittels des Mikrodosiersystems aufgebracht werden können. Durch die Halterung 1 wird nun typischerweise eine Gasatmosphäre um den Proteinkristall 2 herum erzeugt, indem ein Gasstrom definierter Zusammen-  
15 setzung und Temperatur durch den Gaskanal 6 der Halterung 1 geführt wird. Bei dem beschriebenen Verfahren wird es sich typischerweise um einen Luftstrom, ggf. unter Beimischung anderer gasförmiger Substanzen, mit einem geregelten Feuchtigkeitsgehalt (d.h. Wassergehalt) und einer geregelten Temperatur handeln.

20 In die Kristallstruktur des Proteinkristalls soll nun ein Inhibitor eingebracht werden, der Bestandteil einer Substanz ist, die der Lösung zugesetzt wurde, die sich in dem Vorratsgefäß befindet, das mit der Piezopipette verbunden ist. Es hat sich durch Experimente gezeigt, daß lokal auf die Oberfläche des Kristalls aufgebrachte Lösungen (wie bspw. DMSO) mit hoher  
25 Inhibitor-Konzentration den Kristall in der Regel nicht schädigen. Nun werden durch das Steuergerät 17 elektrische Spannungspulse an die Piezopipette 12 angelegt und Mikrotropfen mit der Inhibitor-Lösung auf den Proteinkristall 2 geschleudert. Durch das Aufspritzen einzelner Mikro-Tropfen bleibt der den Proteinkristall umströmende Gasstrom praktisch unbeeinflusst, so daß der Proteinkristall in seiner stabilen definierten Umgebung verbleibt. Die  
30 Erhaltung einer stabilen Umgebung ist insbesondere für die relativ instabilen Proteinkristalle, die durch geringe Gitterkräfte zusammengehalten werden, wichtig, damit die Kristalle nicht zerstört werden, bevor sie z.B. einer röntgenkristallographischen Untersuchung unterzogen

werden. Die Feuchtigkeit des den Kristall umgebenden Luftstroms kann nun im Zusammenspiel mit der Größe und Frequenz der über die Mikrodosiervorrichtung auf den Proteinkristall aufgetragenen Tropfen so eingestellt werden, daß der Kristall möglichst sein Volumen nur wenig ändert, indem ein Gleichgewicht zwischen Abdampfen von Flüssigkeit vom Kristall und Zuwachs an Flüssigkeit durch Auftropfen von Flüssigkeit mittels der Mikrodosiervorrichtung erreicht wird. Dadurch wird der Kristall nur minimal belastet und es kann ein schonendes Einbringen des/der Liganden über die lokal aufgetragenen Mikrotropfen erreicht werden. Dieser Vorgang der Einstellung der optimalen Luftfeuchtigkeit bzw. der optimalen Auftropffrequenz durch die Mikrodosiervorrichtung kann über ein Regelement automatisch geregelt werden, daß entsprechende Änderungen der Feuchtigkeit des Luftstroms und/oder der Auftropffrequenz vornimmt, wenn sich das gemessene Volumen des Kristalls ändert. Ziel ist es dabei, das Volumen des Kristalls möglichst konstant zu halten, d.h. das Volumen typischerweise um nicht mehr als 40%, bevorzugt nicht mehr als 20%, besonders bevorzugt nicht mehr als 10% vom Ausgangsvolumen abweicht. Die Volumensänderung kann dabei über eine Flächenprojektion gemessen werden..

Während des Kristallbehandlungsprozesses kann der Kristall gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung auch mit gepulstem Licht bestrahlt werden, z.B. über ein Stroboskop, um mittels des Videosystems in regelmäßigen Abständen eine Vermessung des Volumens des Tropfens durchführen zu können.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist es auch denkbar, daß der Kristall, der sich in dem Gasstrom definierter Zusammensetzung befindet, von einer Lösung umgeben ist, so daß die durch die Mikrodosiervorrichtung aufgetragenen Tropfen nicht direkt auf den Kristall, sondern in die den Kristall umgebende Lösung gegeben werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung bzw. das erfindungsgemäße Verfahren erweisen sich auch dann besonders vorteilhaft, wenn Liganden, bspw. Inhibitoren oder andere Stoffe, in einen Kristall eingebracht werden sollen, die selbst in einer wäßrigen Lösung nur schwer zu lösen sind. Tatsächlich erweist sich eine Reihe von Liganden als in wäßrigen Systemen ausgesprochen schwer löslich, so daß mit dem in der Beschreibungseinleitung beschriebenen klassischen „Soaking“-Verfahren diese Liganden/Inhibitoren nicht in den Kristall eingebracht

werden können, da die Konzentration der Liganden/Inhibitoren in der wäßrigen Lösung zu gering ist. Wird nun mittels des Mikrodosiersystems eine wäßrige Lösung, in der diese Liganden und/oder Inhibitoren gelöst sind, auf den Kristall aufgetropft, so verdunstet das Wasser nach jedem Auftropfen vollständig, während der Ligand auf bzw. im Kristall verbleibt. Durch  
5 wiederholte Auftropfzyklen können so größere Mengen des (schwer löslichen) Liganden auf den Kristall aufgebracht werden. Der Ligand akkumuliert sich so allmählich auf bzw. im Kristall, bis eine ausreichende Menge des Liganden in den Kristall eingebracht ist und eine zufriedenstellende Ligand-Protein-Komplexbildung (also die Besetzung des Kristalls an den Bindungsstellen der kristallisierten Proteine ausreichend ist, eine Elektronendichte für den Ligan-  
10 den zu bestimmen) erreicht ist.

Der Vorteil bei diesem Verfahren liegt auch darin, daß die Proteinkristalle nicht mit einem weiteren Lösungsmittel versetzt werden müssen und so die Behandlung der empfindlichen Kristalle schonender wird. Außerdem besteht derart nicht die Gefahr, daß der Ligand auf-  
15 grund seiner geringen Löslichkeit auf dem Kristall bzw. in den Lösungsmittelkanälen präzipitiert. Bei diesem Verfahren kann die Menge an durch das Mikrodosiersystem aufzutropfender Lösung durch die Konzentration der Lösung sowie einer Abschätzung der Molarität des Proteins im Kristall berechnet werden. Ein weiterer Vorteil des Verfahrens besteht darin, daß man mit Wasser als dem einzigen Lösungsmittel für den Liganden im Vergleich zu anderen  
20 Lösungsmitteln oder Flüssigkeiten besonders kleine Tropfengrößen erzielen kann, was insbesondere bei kleinen Proteinkristallen wichtig ist, da erfindungsgemäß die Tropfengröße kleiner als die Größe des Kristalls sein sollte.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls mit einem Substrat kann  
25 auch in eine Röntgenbestrahlungsanlage oder Synchrotronbestrahlungsanlage integriert sein, so daß es möglich wird, während der Behandlung des Proteinkristalls mit der Substanz Beugungsbilder des Kristalls aufzunehmen und so den Behandlungsprozeß, d.h. die sukzessive Besetzung der Bindungsstellen des Kristalls, „online“ zu beobachten. Hierzu kann die Halte-  
30 rung 1 z.B. an einem Goniometer einer Röntgen- oder Synchrotron-Bestrahlungsanlage befestigt werden. Der Proteinkristall kann vor der röntgenkristallographischen Untersuchung auch eingefroren werden, was in der Regel unter Verwendung von flüssigem Stickstoff erfolgt (sogenannte Cryo-Kristallographie). Hierdurch werden bei röntgenkristallographischen Un-

tersuchungen die Intensitäten der Reflexe des Beugungsbildes ermittelt und schließlich unter Verwendung der Phaseninformation, z.B. aus isomorpher Ersetzung oder MAD („multiple anomalous scattering“), die Elektronendichte der Struktur ermittelt werden.

- 5 Selbstverständlich können auch andere physikalische, insbesondere spektroskopische, Messungen mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung an dem Kristall durchgeführt werden. So kann die erfindungsgemäße Vorrichtung z.B. auch mit einer Anlage zur Aufnahme einer Absorptionsspektrums kombiniert werden, um das Absorptionsspektrum des Kristalls aufzu-

10

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann auch oder nur dem durch die Halterung 1 geführten Gasstrom ein Lösungsvermittler beigefügt werden, der sich für die in den Proteinkristall einzubringende Substanz eignet, also z.B. ein Lösungsvermittler für einen schwerlöslichen Liganden. Hierzu kann zusätzlich ein Verdampfer vorgesehen sein,

- 15 um den Lösungsvermittler vor der Einleitung in den Gaskanal 9 der Halterung 1 zu verdampfen. Auch kann eine Vorrichtung vorgesehen sein, die dazu dient, die Konzentration des Lösungsvermittlers im Gasstrom variabel einzustellen und den erforderlichen Bedingungen anzupassen. So läßt sich eine im Gegensatz zum klassischen „Soaking“-Prozeß sehr schonende Zufuhr von Lösungsvermittler zu dem Proteinkristall erreichen. Während der Zufuhr des den
- 20 Lösungsvermittler enthaltenden Gasstroms kann dann über die Piezopipette die Ligandenlösung auf den Proteinkristall in Mikro-Tropfenform aufgebracht werden. Insgesamt ergibt sich also erfindungsgemäß die Möglichkeit nur der als Mikrotropfen aufzubringenden Ligandenlösung Lösungsvermittler oder nur dem zugeführten Gasstrom beizumischen. Ggf. können beide Alternativen auch kombiniert werden, so dass sowohl im Mikrotropfen als auch im
- 25 Gasstrom der Lösungsmittelvermittler (gleich oder verschieden) zugesetzt werden.

- Auf erfindungsgemäße Weise lassen sich damit Liganden an den Kristall binden, die mit klassischen „Soaking“-Prozessen nicht gebunden werden können. Zudem ist ein solches erfindungsgemäßes Verfahren im Vergleich zu bisherigen „Soaking“-Prozessen mit geringerem Zeitaufwand verbunden, da wegen der schonenderen Kristallbehandlung weniger Versuche
- 30 unternommen werden müssen, um die Kristallbehandlung erfolgreich zum Abschluß zu bringen.



Die erfindungsgemäße Vorrichtung sowie das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich aber nicht nur zum Einbringen von Liganden in Proteinkristalle. Es können auch eine Reihe von anderen Behandlungsmethoden mit anderen Lösungen an Proteinkristallen auf die erfindungsgemäße Art durchgeführt werden.

5

Auch kann die über die Mikro-Tropfen mittels des Mikrodosiersystems aufgebrauchte Lösung mehrere verschiedene Substanzen enthalten, mit denen der Kristall behandelt werden soll. Es kann sich dabei zum Beispiel um mehrere Liganden, bspum w. mehrere Substrate oder um ein Substrat und um einen katalytisch wirkenden Liganden, handeln, die in einer Lösung gelöst sind, die mittels einer Piezopipette auf den Kristall aufgebracht werden soll.

10

Gemäß einer weiteren Ausführungsform kann die Piezopipette auch mit einem speziellen Flüssigkeitszufuhrsystem versehen sein, mit dem es möglich ist, die Zufuhr verschiedener Flüssigkeiten in die Piezopipette zeitlich in gewünschter Weise zu steuern. In der Fig. 3 ist ein solches Flüssigkeitszufuhrsystem darstellt. Das in der Fig. 3 dargestellte Flüssigkeitszufuhrsystem umfaßt eine Präzisionsspritze 40, die aus einem Zylinder 41 besteht, in dem ein über einen (in der Fig. 3 nicht dargestellten) Motor angetriebener Kolben 42 hin- und herlaufen kann. Wenn der Kolben nach unten läuft, können verschiedene Flüssigkeiten aus den Flüssigkeitsbehältern 43, 44, 45 oder 46 in den Zylinder gesaugt werden, wenn eines der entsprechenden elektrisch ansteuerbaren Ventile 47, 48, 49 bzw. 50 geöffnet wird und zusätzlich das vor dem Zylinder liegende elektrisch steuerbare Ventil 51 geöffnet wird. Wird das Ventil 51 dann wieder geschlossen, das am Auslaß des Zylinders liegende elektrisch steuerbare Ventil 52 geöffnet und der Kolben 42 nach oben getrieben, so kann die angesaugte Flüssigkeit über die zur Piezopipette führende Flüssigkeitszufuhrleitung 53 zur Piezopipette geführt werden, um dann schließlich in Tropfenform auf den Kristall gegeben werden zu können.

15

20

25

Die Behälter 45 und 46 können z.B. zwei verschiedene Lösungen mit verschiedenen Liganden enthalten, die mit dem Protein des zu betropfenden Kristall einen Komplex bilden sollen. Die Behandlung des Kristalls kann dabei z.B. so erfolgen, daß zunächst die Lösung 1 aus dem Behälter 45 und danach die Lösung 2 aus dem Behälter 46 auf den Kristall aufgetropft wird. Zwischen den beiden Lösungen kann eine Reinigungslösung durch die Leitungen gespült werden, die sich in dem Behälter 44 befindet. Der weitere Behälter 47 dient als Abfallbehälter,

30

um Flüssigkeitsmengen aufzunehmen, die nicht mehr benötigt werden und aus dem Zufuhrsystem entfernt werden müssen. Durch geeignete zeitliche Ansteuerung der Ventile 47 – 52 und des Kolbens 42 können nun der Piezopipette die gewünschten Lösungen in der gewünschten Menge zugeführt werden.

5

Ein weiteres Beispiel zur Anwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens ist das sogenannte „Back-Soaking“, bei dem bestimmte an die Kristallstruktur des Proteins bereits gebundene Substanzen durch andere Substanzen ausgetauscht werden, es wird also ein Cokristall erneut mit dem Ziel einer Substitution „gesoakt“. So kann z.B. ein Ligand durch einen anderen Li-  
10 ganden, der sich in der Lösung befindet, die über Mikro-Tropfen auf den Proteinkristall aufgebracht wird, ersetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann ferner auch dazu verwendet werden, in sehr schonender Weise sogenannte „Cryo-Puffer“ auf einen Proteinkristall (komplexiert oder nicht-  
15 komplexiert) aufzubringen. Viele Proteinkristalle müssen vor der röntgenkristallographischen Untersuchung aus Stabilitätsgründen eingefroren werden, was, wie oben beschrieben, in der Regel unter Verwendung von flüssigem Stickstoff durchgeführt wird. Die Cryo-Puffer werden während des Einfrierprozesses verwendet, um die Eisbildung zu verhindern, die zur Zerstörung des Proteinkristalls führen würde. Beispiele für Cryo-Puffer sind Glycerin oder 2-  
20 Methyl-2,4-pentandiol (MPD). Die Cryo-Puffer können in das Vorratsgefäß der Piezopipette gefüllt werden und dann in ähnlicher Weise wie die Ligandenlösung mit der Mikrodosiervorrichtung auf den Proteinkristall gespritzt werden.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können auch mehrere Mikrodosiersysteme, z.B. mehrere Piezopipetten, verwendet werden, mit denen jeweils unterschiedliche  
25 oder auch identische Substanzen (bspw. an zwei verschiedenen, lokal abgegrenzten Bereichen des Kristalls) auf den Kristall aufgebracht werden. Eine solche Anordnung kann z.B. von Vorteil sein, wenn zwei verschiedene Liganden in eine Proteinkristallstruktur eingebracht werden sollen. Die Liganden werden dann in verschiedenen Lösungen gelöst, die in die bei-  
30 den Flüssigkeitsvorratsbehälter zweier Piezopipetten gegeben werden. Über die beiden Piezopipetten werden dann die beiden Lösungen mit den verschiedenen Liganden in Mikro-Tropfenform auf den Proteinkristall aufgebracht. Dabei können über das mit einer Piezopi-

pette jeweils verbundene Steuergerät, das die Tropfenerzeugung steuert, unterschiedliche Spannungsimpulse und Spannungspulsfolgen an die Piezopipetten angelegt werden, um so eine optimale Form und Frequenz der Mikro-Tropfen zu erreichen, die für den jeweiligen Liganden ideal ist.

5

Die Verwendung von zwei Mikrodosiersystemen, mit denen getrennt zwei verschiedene Substanzen aufgebracht werden, die erst auf dem Kristall zusammentreffen, ist insbesondere auch dann vorteilhaft, wenn das kristallisierte Protein Katalysatorfunktion für die beiden Substanzen, die beide als Reaktanden im kristallisierten Protein gebunden werden, hat. Erfolgt das  
10 Aufspritzen der beiden Reaktanden separat durch zwei Mikrodosiersysteme während der Röntgenbestrahlung des Proteinkristalls, kann die Reaktion der Reaktanden unter katalytischem Einsatz der kristallisierten Proteine verfolgt werden. Eine Voraussetzung für eine derartige röntgenkristallographische Untersuchung ist natürlich die Stabilität des Kristalls, d.h., daß der Kristall seine Struktur nicht durch strukturelle Umlagerungen der kristallisierten Proteine verlieren darf, da er dadurch auch sein Diffraktionsvermögen verlieren würde.  
15

Auch das sogenannte „Cryo-Soaking“ läßt sich mit dem erfindungsgemäßen Verfahren in besonders vorteilhafter Weise durchführen. Das „Cryo-Soaking“ ist durch die Kombination aus Ligandenzugabe und gleichzeitigem Einfrieren eines Proteinkristalls gekennzeichnet. So  
20 können z.B. Übergangszustände des Proteinkristalls eingefroren und dann röntgenkristallographisch untersucht werden. Auch hierzu kann ein System verwendet werden, das mit mehreren Mikrodosiersystemen arbeitet, wobei über das eine Mikrodosiersystem z.B. der oben beschriebene Cryo-Puffer und über das andere Mikrodosiersystem eine Lösung in Mikro-Tropfenform auf den Proteinkristall gegeben werden, die den in den Proteinkristall einzubringenden Liganden enthält.  
25

Eine weitere Anwendung wäre etwa das Aufspritzen von Reaktanden, die in bestimmter Weise mit dem Proteinkristall reagieren.

30 Es ist gemäß einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens auch denkbar, daß dem durch die Halterung für den Kristall geführten Gasstrom gewisse Substanzen zugefügt werden, mit denen der Kristall behandelt werden soll. So könnte z.B. beim „So-

aking“ dem Gasstrom ein in die Proteinkristallstruktur einzubringender Ligand beigemischt werden, während mit dem Mikrodosiersystem Lösungsmittel für diesen Liganden aufgetropft wird oder eine Lösung aufgetropft, in der ein weiterer Ligand gelöst ist, der gleichzeitig mit dem über den Gasstrom zugeführten Liganden in die Kristallstruktur des Proteinkristalls eingebaut werden soll. Das Lösungsmittel für den Liganden kann natürlich zusätzlich auch über  
5 den Gasstrom dem Kristall zugeführt werden. Hierzu kann ein Verdampfer eingesetzt werden, um das Lösungsmittel vorher in die Gasphase zu überführen. Auch ein Ligand, der über den Gasstrom zugeführt werden soll, kann über den Verdampfer dem Gasstrom zugeführt werden. Auch beim oben beschriebenen Cryo-Soaking kann z.B. über den Gasstrom Lösungsmittel mit Ligand dem Proteinkristall zugeführt werden, während über das Mikrodosiersystem ein Cryo-Puffer auf den Mikrokristall aufgetropft wird.  
10

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann ein erfindungsgemäßes Verfahren im Wege des Hochdurchsatzes auch zur Identifikation von Verbindungen  
15 genutzt werden, die Komplexbildungseigenschaften aufweisen. Hierzu sind erfindungsgemäße Verfahren geeignet, wobei ein Kristall, wie bspw. in der DE 198 42 797 C1 oder in Figur 1 gezeigt montiert wird und (a) ein potentieller Ligand nach einem erfindungsgemäßen Verfahren auf den Kristall aufgebracht wird, (b) in einem zeitlichen Abstand von variabler Länge Beugungsintensitäten gemessen werden, wobei mindestens eine Aufnahme, vorzugsweise 2  
20 bis 10 Aufnahmen, zu jedem Zeitpunkt aufgenommen werden, und (c) diese im zeitlichen Abstand gemessenen Beugungsintensitäten, die typischerweise verschiedene Akkumulationszustände des potentiellen Liganden auf dem Kristall widerspiegeln, miteinander in ihrer zeitlichen Abfolge verglichen werden. Hierbei ist es besonders bevorzugt, wenn der Kristall in einer Orientierung während aller Beugungsaufnahmen verbleibt. Auf diesem Weg wird es  
25 erfindungsgemäß möglich mit nur einem Kristall und einzelnen Röntgenaufnahmen (ohne einen vollständigen Datensatz aufnehmen zu müssen), die Komplexbildung nachzuweisen und damit die Testsubstanz als Liganden oder als nicht-bindend zu identifizieren. Mit zunehmender Komplexbildung nimmt nämlich die Korrelation zum völlig unbesetzten Ausgangszustand des Kristalls ab, weswegen (im zeitlichen Abstand wachsende) Intensitätsunterschiede des Reflexe die Komplexbildung indizieren. Ein derartiges Verfahren kann als Hochdurchsatzverfahren durchgeführt werden, da eine nichtbindende Substanz verworfen werden kann  
30 und mit einer anderen Substanz das Verfahren gemäß Schritten (a) bis (c) wiederholt werden

kann. Innerhalb von wenigen Minuten kann erfindungsgemäß eine Testsubstanz als Ligand identifiziert oder als nichtbindend verworfen werden.

Die vorliegende Erfindung wird durch die Figuren 4 und 5 näher erläutert:

5

**Figur 4:** Der kovalent gebundene Inhibitor sowie einzelne Aminosäuren in der Umgebung des Aktiven Zentrums des Thrombins um Ser195 sind als stick-Modell dargestellt. Sauerstoffatome sind rot, Schwefelatome gelb, Stickstoffatome blau und Kohlenstoffatome grau dargestellt. Der Inhibitor ist zusätzlich von seiner  $2F_o - F_c$ -Elektronendichte (kontouriert bei  $1\sigma$ ) überlagert. Der Inhibitor ist in seiner Elektronendichte eindeutig definiert.

10

In der experimentell bestimmten Elektronendichte ist deutlich die kovalente Bindung des PMSFs am Ser195 zu erkennen (Figur 4), die sich von der des ursprünglich im Kristall gebundenen Benzamidins signifikant unterscheidet. Damit wurde der Beweis geführt, daß der Ansatz des Auftropfens von Picoliter-Tropfen auf einen Proteinkristall unter Verwendung des Free Mounting Systems funktioniert

15

**Figur 5:**

Das Spaltprodukt Pro-Ile des Inhibitors Diprotin A sowie einzelne Aminosäuren in der Umgebung des Aktiven Zentrums der DPIV um Ser630 sind als stick-Modell dargestellt. Sauerstoffatome sind rot, Stickstoffatome blau und Kohlenstoffatome grau dargestellt. Der Inhibitor sowie Ser630, das kovalent an den Inhibitor gekoppelt ist, ist zusätzlich von seiner  $2F_o - F_c$ -Elektronendichte (kontouriert bei  $1\sigma$ ) überlagert. Der Inhibitor ist in seiner Elektronendichte eindeutig definiert (Figur 5).

20

Vom eingesetzten Tripeptid mit der Sequenz Ile-Pro-Ile ist das C-terminale Isoleucin abgespalten, während das Dipeptid kovalent mit Ser630 weiterhin verknüpft ist und nicht abgespalten wird. Insofern verhält sich Diprotin A eher wie ein Suizid-Substrat und nicht wie ein Inhibitor.

25

Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Verfahren Gegenstand der vorliegenden Patentanmeldung, bei dem die erfindungsgemäße Behandlung eines frei montierten Kristalls mit einer Vorrichtung zur Erzeugung von Mikrotropfen im Stapelbetrieb erfolgt, um mit einem hohen Durchsatz an zu komplexierenden Kristallen arbeiten zu können. Hierzu wird/werden erfindungsgemäß zunächst (a) der Kristall bzw. die Kristalle, vorzugsweise frei montiert, vorgehalten. Diese Vorhaltung der Kristalle bis zum nächsten Verfahrensschritt (b) kann bspw. durch Lagerung der Kristalle in tiefgeköhltem Zustand oder aber, stärker bevorzugt, in einem abgeschlossenen Gefäß (z.B. Vials) im Dampfgleichgewicht mit der Kristallisationsflüssigkeit erfolgen, um die Unversehrtheit des Kristalls bzw. der Kristalle bis zum Verfahrensschritt (b) sicherzustellen. Im Verfahrensschritt (b) werden auf die die frei montierten Kristalle, wie erfindungsgemäß offenbart, Mikrotropfen einer bspw. einen Liganden enthaltenden Lösung aufgetragen, um den Kristall bspw. mit einem Liganden zu komplexieren. Nach der Komplexierung müssen die erfindungsgemäß behandelten Kristalle in einem Verfahrensschritt (c) gelagert werden, ehe in Verfahrensschritt (d) die röntgenkristallographische Untersuchung erfolgen kann. Die Lagerung in Verfahrensschritt (c) wird typischerweise in tiefgeköhltem Zustand, vorzugsweise in flüssigem Stickstoff, erfolgen. Die Durchführung der Verfahrensschritte (a) bzw. (c) kann bspw. in Probenwechseln erfolgen, wie sie in der Cryokristallographie eingesetzt werden, sog. „Autosampler“ (z.B. vertrieben von Riken, Kouto, Japan oder X-Ray Research GmbH, Norderstedt, Deutschland). Hierbei werden die Proben auf einem Probenträger angeordnet und dieser horizontal verschoben, um im Stapelbetrieb Proben durch eine Probenaufnahmevorrichtung aufnehmen zu können. Die Steuerung erfolgt automatisch. Gleichzeitig ist eine Vorrichtung zur Tiefköhlung vorgesehen.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher beschrieben.

## Ausführungsbeispiele

### 1. Ausführungsbeispiel

#### Bindung von Phenylmethylsulfonyl-Flourid (PMSF) an humanes $\alpha$ -Thrombin

Ein Thrombin-Kristall wurde bei der zuvor ermittelten Startfeuchte von 93 % mit einem „Loop“ auf dem Free Mounting System montiert. Überschüssiger Reservoirpuffer wurde aus

dem „Loop“ vorsichtig unter dem Mikroskop mit einem Filterpapierstreifen entfernt. Die Stabilität bzw. die Konstanz der Größe des Kristalls wurde mit Hilfe des Videosystems kontrolliert.

5 Darauf wurde die Piezopipette mit einer 100 mM Lösung von PMSF, einem Liganden (Inhibitor) von Thrombin, in Isopropanol befüllt. Es wurde hier eine hochkonzentrierte PMSF-Lösung in einem organischen Lösungsmittel verwendet.

Anschließend wurde der Kristall mit einzelnen Tropfen („single shot“ Modus) der Lösung „beschossen“. Das insgesamt aufgetropfte Volumen entsprach ungefähr dem Volumen des Kristalls, also ca. 300 pL. Bei der sehr hohen eingesetzten PMSF-Konzentration entspricht  
10 dies ca. einem 3-4-fachen molaren Überschuß des Inhibitors. Dabei wurde nach jedem Auftropfen die Projektion der Fläche des Kristalls beobachtet und bis zum nächsten Auftropfen so lang gewartet, bis die Fläche wieder konstant blieb. Die einzelnen Parameter des Experiments sind Tabelle 1 zu entnehmen.

15

Tabelle 1

Startfeuchte [% r.h.]	93
Größe der aufgebrachten Tropfen [pL]	ca. 30
Anzahl der aufgebrachten Tropfen	10
Spannung [V]	39,1
Pulsweite [µs]	450

Nach Abschluß des Auftropfens wurde der Kristall mit PFPE-Öl (Perfluoropolyether) benetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der röntgenkristallographische Datensatz wurde auf einer rotierenden Kupferanode aufgenommen. Die Prozessierung der Daten erfolgte mit den Programmen XDS und XSCALE, Verfeinerung und manueller Modellbau  
20 wurden mit den Programmen CNX und O durchgeführt. Die Statistiken von Datensammlung, Prozessierung und Verfeinerung sind in Tabelle 2 angegeben. Trotz des Auftropfens des

reinen Lösungsmittels wurde die Diffraktionsqualität des Kristalls nicht beeinträchtigt, wie insbesondere anhand des Wertes von  $R_{\text{mes}}$  zu erkennen ist.

Tabelle 2

Inhibitor	PMSF
Strahlungsquelle	Rotierende Kupferanode
Wellenlänge [Å]	1,5418
Detektor	MAR Imageplate
Temperatur [K]	100
Raumgruppe	C2
Zellparameter:	
$a \neq b \neq c$ [Å]	70,8; 72,8; 72,7
$\alpha = \gamma = 90^\circ$ ; $\beta$ [°]	99,77
Auflösung [Å]	2,57
Unabhängige Reflexe	10892
$I/\sigma$ <sup>1</sup>	7,3 (2,9)
Vollständigkeit <sup>1</sup> [%]	91,7 (94,5)
$R_{\text{mes}}$ <sup>1,2</sup> [%]	11,8 (40,4)
$R_{\text{crys}}$ <sup>1</sup> [%]	19,8
$R_{\text{free}}$ <sup>2</sup> [%]	26,4

5

<sup>1</sup> Werte in Klammer gelten für die äußerste Auflösungsschale

$$^2 R_{\text{mes}} = \sum |I_{\text{obs}} - \langle I \rangle| / \sum \langle I \rangle$$



Eine graphische Darstellung der Ergebnisse der röntgenkristallographischen Untersuchung ist Figur 4 zu entnehmen.

## 2. Ausführungsbeispiel

### 5 Bindung von Diprotin A an Dipeptidyl-Peptidase IV (DPIV) aus Schwein

Die Kristalle der DPIV zeigen im nativen Zustand ein nur sehr eingeschränktes Streuverhalten. Erst durch Feuchte-Optimierung mit dem „Free Mounting System“ lässt sich die erreichbare Auflösung der Kristalle aber entscheidend verbessern. Im optimierten Zustand bei reduzierter Feuchte zeichnen sich die Kristalle zudem durch eine erhöhte Stabilität aus und  
10 sind somit besser für „Soaking“-Experimente durch das Auftropfen geeignet.

Im vorliegenden Experiment wurde ein Kristall der DPIV bei der zuvor bestimmten Startfeuchte von 97 % mit dem „Free Mounting System“ montiert. Zur Optimierung wurde die Feuchte in einem Gradient von 0,5 % Feuchteänderung pro 60 s auf 89 % r.h. abgesenkt. Die Transformation des Kristalls, die durch eine deutliche Verbesserung der Auflösung gekennzeichnet ist, beginnt bereits bei 94 % r.h. und erreicht bei 89 % r.h. ihr Maximum. Während  
15 des Auftropfens wurde daher die Feuchte konstant gehalten.

Als Ligand wurde eine Inhibitor-Lösung von wässriger Diprotin A Lösung (50 mM) verwendet. Bei Verwendung einer wässrigen Lösung sind im Vergleich zu organischen Lösungsmitteln kleinere Tropfengrößen zu erreichen, wodurch der Kristall noch schonender behandelt  
20 wird. Während des Auftropfens der Lösung wurde permanent die Fläche des Kristalles beobachtet und erst dann der nächste Tropfen aufgetragen, wenn die Fläche sich nicht mehr änderte. Die Gesamt-Menge an aufgetropften Inhibitor entspricht einem ca. 10-fachen molaren Überschuss. Die einzelnen Parameter des Experiments sind Tabelle 3 zu entnehmen.

25

Tabelle 3

Startfeuchte [% r.h.]	97
Feuchte-Gradient	0,5 %/60s
Optimum der Feuchte [%]	89

Größe der aufgetragenen Tropfen [pl]	ca. 5-10
Anzahl der aufgetragenen Tropfen	80
Spannung [V]	39,2
Pulsweite [ $\mu$ s]	10

Nach Beendigung des Auftropfen wurde der Kristall unter Verwendung von PFPE-Öl (Perfluoropolyether) als *Cryo-Protectant* in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die anschließende röntgenkristallographische Datensatzaufnahme erfolgte auf einer rotierenden Kupferanode.

- 5 Prozessiert wurden die Daten mit den Programmen XDS und XSCALE, Verfeinerung und manueller Modellbau wurden mit den Programmen CNX und O durchgeführt. Die Statistiken von Datensammlung, Prozessierung und Verfeinerung sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4

Inhibitor	Diprotin A
Strahlungsquelle	Rotierende Kupferanode
Wellenlänge [Å]	1,5418
Detektor	MAR Imageplate
Temperatur [K]	100
Raumgruppe	P1
Zellparameter:	
$a \neq b \neq c$ [Å]	62,3; 118,5; 133,1
$\alpha \neq \beta \neq \gamma$ [°]	112,7; 94,9; 90,9
Auflösung [Å]	2,59

Unabhängige	103898
Reflexe	
$I/\sigma^1$	14,0 (4,1)
Vollständigkeit <sup>1</sup>	93,5 (89,4)
[%]	
$R_{\text{meas}}^{1,2}$ [%]	6,1 (28,0)
$R_{\text{crys}}^1$ [%]	22,6
$R_{\text{free}}^2$ [%]	27,5

---

Die Ergebnisse der röntgenkristallographischen Untersuchung sind in Figur 5 dargestellt. Mit diesem Ausführungsbeispiel wird das große Potential erfindungsgemäßer Verfahren unter Verwendung von Microdosiersystemen (und Free Mounting) deutlich, da hier parallel ein Kristall optimiert und durch das Auftropfen ein Inhibitor gebunden werden konnte.

### 3. Ausführungsbeispiel

#### 10 Bindung von Pefabloc an humanes $\alpha$ -Thrombin durch langsames Akkumulieren

Eine weitere Möglichkeit, insbesondere schwerlösliche Liganden (Inhibitoren) an kristallisierte Proteine zu binden, besteht im langsamen Akkumulieren des Inhibitors, der im wässrigen System gelöst ist. Beim klassischen „Soaking“ ist man stets darauf angewiesen, daß die Konzentration des Inhibitors in der Lösung nicht zu gering ist. Daher ist es häufig notwendig, dem Ansatz zur Erhöhung der Löslichkeit Lösungsmittel beizumischen, was die empfindlichen Proteinkristalle u.U. schädigt oder sogar zerstört.

Mit einer erfindungsgemäßen Vorrichtung bzw. bei Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens wurde zur schonenderen Behandlung ganz auf Lösungsmittel verzichtet, da sich der Inhibitor auch bei nur geringer Löslichkeit durch häufiges Auftropfen im Kristall akkumuliert, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Bindung wesentlich erhöht wird. Durch die Be-

obachtung des Kristalls mit dem Videosystem wurde gewährleistet, daß der Kristall nicht zu stark befeuchtet wurde. Ein neuer Tropfen wurde erst dann aufgebracht, wenn der vorherige Tropfen bereits verdunstet war. Aus den Angaben über die Löslichkeit des jeweiligen Inhibitors, der Tropfengröße und der Anzahl der Moleküle im Kristall konnte sogar die Anzahl der aufzubringenden Tropfen berechnet werden.

Als Inhibitor wurde Pefabloc SC (4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonyl-fluorid-hydrochlorid, K<sub>i</sub>: 6,5 µM) verwendet, der sich durch eine hohe Stabilität im wässrigen System auszeichnet.

Es wurde die Anzahl benötigter Tropfen für eine Stöchiometrie von Inhibitor zu Protein von 2:1 errechnet unter folgenden Randbedingungen: bei einem Kristall-Volumen von 300 µl und einer Dichte des Kristalls von ca. 1,3 g/ml ergab sich für die Masse des Kristalls = 390 ng. Unter Berücksichtigung des Molekulargewichts von Thrombin (ca. 40 kDa) ergab sich eine Konzentration des Thrombins im Kristall ca. 9,75 pmol/300 µl bzw. 32,5 mM. Da es das Ziel war, den Inhibitor im stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 aufzubringen, um eine möglichst hohe Besetzung zu erreichen, betrug die benötigte Menge des Inhibitors: 19,5 pmol (9,75 pmol x 2).

Die Menge an aufzutropfender Inhibitor-Lösung hängt von der Konzentration des Inhibitors ab und wurde experimentell für drei Konzentrationen unter der Annahme einer Tropfengröße von 10 µl, wie sie bei Verwendung von Wasser realisierbar ist, gewählt, wie in Tabelle 5 dargestellt. Bei einer üblichen relativen Feuchte zwischen 90 und 100 % r.h. konnte regelmäßig 1 Tropfen pro sec auf den Kristall aufgebracht werden. Die Frequenz wurde aber deutlich erhöht, wenn bei reduzierter Feuchte im Hüllstrom, die zu einem Austrocknen der Kristalle führt, der Verlust an Feuchtigkeit durch ein schnelleres Auftropfen ausgeglichen und somit die rel. Feuchte am Kristall konstant gehalten werden mußte. Dadurch wurde eine Frequenz von 20 Tropfen pro Sekunde ermöglicht. Die sich daraus bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen ergebenden Zeiten sind ebenfalls in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5

Inhibitor-Konzentration	Gesamtvolumen an aufzutropfender Lösung [µl]	Anzahl der Tropfen (Tropfenvolumen 10 µl)	Dauer des Experiments [h] bei 20 Tropfen/sec
-------------------------	--	---	--

100 $\mu\text{M}$	0,195	19.500	0,3
10 $\mu\text{M}$	1,95	195.000	2,7
1 $\mu\text{M}$	19,5	1.950.000	27,1

Beim Experiment mit humanen  $\alpha$ -Thrombin und dem Inhibitor Pefabloc unter Verwendung einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  wurden die folgenden, aus Tabelle 6 entnehmbaren experimentellen Parameter gewählt. Durch die erhöhte Frequenz beim Auftropfen wurde die reduzierte Feuchte während des Experimentes ausgeglichen werden.

5

Tabelle 6

Startfeuchte [% r.h.]	93
Feuchte beim Auftropfen [% r.h.]	ca. 80
Inhibitor-Konz. [ $\mu\text{M}$ ]	100
Größe des Proteinkristalls [pl]	250
Größe der aufzubringenden Tropfen [pl]	ca. 10
Frequenz [ $\text{s}^{-1}$ ]	10
Anzahl der aufzubringenden Tropfen	17.000
Spannung [V]	41,0
Pulsweite [ $\mu\text{s}$ ]	450

**Patentansprüche**

- 5 1. Vorrichtung zum Behandeln eines Kristalls mit einer Flüssigkeit mit einer Halterung zur Befestigung des Kristalls und mindestens einem Mikrodosiersystem, das im Verhältnis zur Halterung so angeordnet ist, daß damit Mikro-Tropfen der Flüssigkeit auf den in der Halterung befestigten Kristall aufgebracht werden können.
- 10 2. Vorrichtung nach Anspruch 1, die darüber hinaus ein Mittel umfaßt, mit dem während des Auftropfens der Flüssigkeit um den Kristall herum eine definierte Umgebung erzeugt werden kann.
- 15 3. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, bei der das Erzeugen der definierten Umgebung darin besteht, einen Gasstrom definierter Zusammensetzung um den Kristall herum zu erzeugen.
- 20 4. Vorrichtung nach Anspruch 1 und 3, bei der die Halterung darüber hinaus so ausgebildet ist, daß durch die Halterung der Gasstrom so geführt werden kann, daß er auf den in der Halterung befestigten Kristall gerichtet ist.
- 25 5. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Halterung aus einem Trägerblock für eine Haltekapillare besteht, die ein freies Auflageende für den Kristall besitzt.
- 30 6. Vorrichtung nach Anspruch 5, bei der die Haltekapillare aus einer Mikropipette besteht, in der sich ein Unterdruck erzeugen läßt, um den Kristall zu halten.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 oder 6, bei der der Trägerblock der Halterung einen integralen Gaskanal mit einem Mündungsende enthält, das auf das Auflageende der Haltekapillare gerichtet ist.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 7, die darüber hinaus ein Gasmischmittel aufweist, mit dem die Zusammensetzung des Gasstroms variabel eingestellt werden kann.
9. Vorrichtung nach Anspruch 8, bei der das Gas aus Luft mit einem bestimmten Feuchtigkeitsgehalt besteht und das Gasmischmittel so ausgebildet ist, daß damit die Luftfeuchtigkeit eingestellt werden kann.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 9, die darüber hinaus ein Lösungsvermittlerbeigabemittel umfaßt, mit dem dem Gasstrom ein Lösungsvermittler für eine in die Kristallstruktur des Kristalls einzubringende Substanz beigemischt werden kann.
11. Vorrichtung nach Anspruch 10, die darüber hinaus ein Konzentrationseinstellmittel zur Einstellung der Konzentration des Lösungsvermittlers umfaßt.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 3 bis 11, die darüber hinaus ein Temperatureinstellmittel umfaßt, mit dem die Temperatur des Gasstroms variabel eingestellt werden kann.
13. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der das Mikrodosiersystem so ausgebildet ist, daß es Mikro-Tropfen der auf den Kristall aufzubringenden Flüssigkeit erzeugen kann, die ein Volumen aufweisen, das kleiner als das Volumen des Kristalls ist.
14. Vorrichtung nach Anspruch 13, bei der das Mikrodosiersystem so ausgebildet ist, daß es Mikro-Tropfen erzeugen kann, deren Volumen zwischen 10 und 20 Prozent des Kristallvolumens und vorzugsweise zwischen 5 und 10 Prozent des Kristallvolumens beträgt.
15. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 11 oder 12, bei der das Mikrodosiersystem so ausgebildet ist, daß es Mikro-Tropfen erzeugen kann, deren Volumen zwischen 1 nl und 100 pl, vorzugsweise zwischen 100 pl und 20 pl und noch bevorzugt zwischen 20 pl und 4 pl liegt.

16. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der das Mikrodosiersystem darüber hinaus ein Flüssigkeitszufuhrsystem aufweist, mit dem verschiedene Flüssigkeiten, die auf den Kristall aufgetropft werden sollen, in zeitlich gesteuerter Weise einem Tropfenerzeugungsteil des Mikrodosiersystems zugeführt werden können.
- 5
17. Vorrichtung nach Anspruch 16, bei der das Flüssigkeitszufuhrsystem des Mikrodosiersystems umfaßt eine elektrisch ansteuerbare Präzisionsspritze und ein Leitungssystem umfaßt, mit dem die Präzisionsspritze über elektrisch steuerbare Ventile mit verschiedenen Flüssigkeitsvorratsbehältern und mit dem Tropfenerzeugungsteil des Mikrodosiersystems verbunden werden kann, um diesem Flüssigkeit für die Tropfenerzeugung zuzuführen.
- 10
18. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der das Mikrodosiersystem so ausgebildet ist, daß es eine Piezopipette umfaßt, die das Tropfenerzeugungsteil bildet.
- 15
19. Vorrichtung nach Anspruch 18, bei der die Piezopipette aus einer Kapillare besteht, die von einem piezoelektrischen Element umschlossen ist.
- 20
20. Vorrichtung nach Anspruch 18 oder 19, bei der das Mikrodosiersystem darüber hinaus ein mit der Piezopipette elektrisch verbundenes Steuergerät umfaßt, das so ausgebildet ist, daß damit unterschiedlich geformte Spannungspulse an die Piezopipette angelegt werden können, deren Formen die Form und Größe der Mikro-Tropfen und deren Frequenz die Frequenz der Mikro-Tropfen steuern.
- 25
21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, bei der das Mikrodosiersystem eine Kapillare und ein in der Kapillare angeordnetes Mikroventil umfaßt.
- 30
22. Vorrichtung nach Anspruch 21, bei der das Mikrodosiersystem darüber hinaus ein Steuergerät zum Ein- und Ausschalten des Mikroventils umfaßt, um die Mikro-Tropfen zu erzeugen.
23. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, die mehrere Mikrodosiersysteme umfaßt, die im Verhältnis zur Halterung so angeordnet sind, daß damit Mikro-



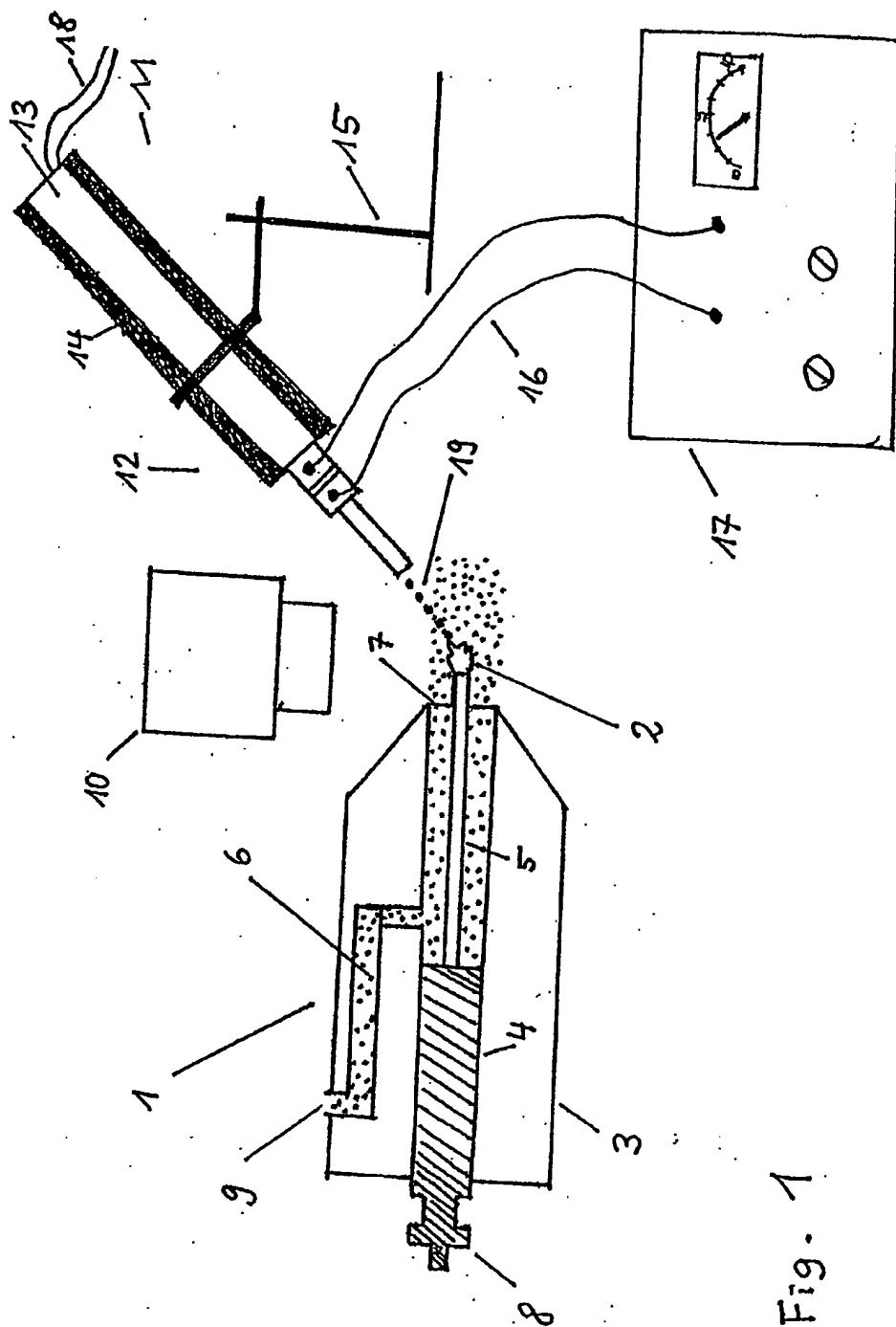
Tropfen verschiedener Flüssigkeiten auf den in der Halterung befestigten Kristall eingebracht werden können.

24. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Halterung darüber  
5 hinaus so ausgebildet ist, daß sie zur Befestigung eines Proteinkristalls geeignet ist.
25. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Flüssigkeit aus einer Lösung besteht.
- 10 26. Vorrichtung nach Anspruch 21, bei der in der Lösung eine Substanz oder mehrere Substanzen gelöst ist bzw. sind, die in die Struktur des Kristalls eingebracht werden soll bzw. sollen oder mit dieser reagieren soll bzw. sollen.
27. Vorrichtung nach Anspruch 26, bei der die Substanz bzw. die Substanzen aus einem oder  
15 mehreren Liganden oder Inhibitoren besteht bzw. bestehen.
28. Vorrichtung nach Anspruch 26, bei der die Substanz bzw. die Substanzen einen oder mehrere Reaktanden enthält bzw. enthalten, der bzw. die mit dem oder im Proteinkristall reagieren soll bzw. sollen.
- 20 29. Vorrichtung nach Anspruch 25, bei der die Lösung aus Wasser besteht, in dem eine Substanz gelöst ist, die mit dem Proteinkristall wechselwirken soll.
30. Vorrichtung nach Anspruch 29, bei der die Substanz aus einem Inhibitor oder Liganden  
25 besteht, der in Wasser nur schwer löslich ist.
31. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der die Flüssigkeit einen Cryo-Puffer enthält.
- 30 32. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, bei der der Kristall in der Halterung nicht in einer Flüssigkeit, bspw. der Mutterlösung, angeordnet ist.

33. Goniometerkopf mit einer Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
34. Röntgenbestrahlungsanlage mit einer Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
- 5 35. Synchrotronbestrahlungsanlage mit einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 33.
36. Verfahren zum Behandeln eines Kristalls mit einer Flüssigkeit mit den folgenden Schritten:
- 10 - es wird der Kristall befestigt, insbesondere ohne in einer flüssigen Umgebung eingebettet zu sein, und
- es werden Mikro-Tropfen der Flüssigkeit auf den Kristall aufgebracht.
37. Verfahren nach Anspruch 36, bei dem darüber hinaus während des Auftropfens der Mikro-Tropfen um den Kristall herum eine definierte Umgebung erzeugt wird.
- 15 38. Verfahren nach Anspruch 37, bei dem das Erzeugen der definierten Umgebung das Erzeugen eines Gasstroms definierter Zusammensetzung um den Kristall herum umfaßt.
- 20 39. Verfahren nach Anspruch 38, bei dem der Gasstrom aus einem Luftstrom mit kontrollierter Luftfeuchtigkeit besteht.
40. Verfahren nach Anspruch 38, bei dem der Gasstrom während des Auftropfens geregelt wird.
- 25 41. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 oder 40, bei dem die Luftfeuchtigkeit des Gasstroms und die Frequenz, mit der die Tropfen durch das Mikrodosiersystem auf den Kristall aufgetropft werden, während des Auftropfens so aufeinander abgestimmt werden, daß der Kristall möglichst wenig belastet wird, insbesondere das Volumen des Kristalls sich
- 30 um nicht mehr als 20%, insbesondere um nicht mehr als 10% verändert.

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 41, bei dem der Gasstrom einen Lösungsvermittler in kontrollierter Konzentration für eine auf den Kristall aufzubringende Substanz umfaßt.
- 5 43. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 42, bei dem das Volumen der Mikro-Tropfen kleiner als das Volumen des Kristalls ist.
44. Verfahren nach Anspruch 43, bei dem die Mikro-Tropfen der Lösung ein Volumen zwischen 1 nl und 100 pl, vorzugsweise zwischen 100 pl und 20 pl und noch bevorzugt zwischen 20 pl und 4 pl aufweisen.
- 10 45. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 44, bei dem der Kristall ein Proteinkristall ist.
46. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 45, bei dem die Flüssigkeit aus einer Lösung besteht, wobei die Lösung ggf. auf eine Temperatur oberhalb von 20°C erwärmt ist.
- 15 47. Verfahren nach Anspruch 46, bei dem die Lösung eine oder mehrere Substanzen enthält, die einen oder mehrere Liganden und/oder Inhibitoren enthält bzw. enthalten.
- 20 48. Verfahren nach Anspruch 46 oder 47, bei dem die Lösung aus Wasser oder einem organischen Lösungsmittel oder einem Gemisch aus organischen Lösungsmittel(n) und/oder Wasser besteht, in dem eine Substanz enthalten ist, die mit dem Proteinkristall wechselwirken soll.
- 25 49. Verfahren nach Anspruch 47 oder 48, bei dem die Substanz aus einem Inhibitor oder Liganden besteht, der in Wasser nur schwer löslich ist.
50. Verfahren nach Anspruch 36, bei dem die Flüssigkeit aus einem Cryo-Puffer besteht.
- 30 51. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 50, bei dem der Gasstrom eine oder mehrere Substanzen enthält, die einen oder mehrere Liganden und/oder Inhibitoren enthält bzw. enthalten.

52. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche 36 bis 51, bei dem der Kristall mit Hilfe eines Verdampfers mit Lösungsmittel, insbesondere organischem Lösungsmittel, bedampft wird.
- 5 53. Verfahren zur Ermittlung einer proteinkristallographischen Struktur, ggf. eines Komplexes eines Proteins und einer Substanz, wobei die Verfahrensschritte nach einem der Ansprüche 36-52 durchgeführt werden und darüber hinaus der Kristall mit Röntgenstrahlung oder Synchrotronstrahlung bestrahlt wird und das Beugungsbild des Kristalls aufgenommen wird.
- 10 54. Verfahren nach Anspruch 53, bei dem die Bestrahlung während der Behandlung des Kristalls mit der Flüssigkeit stattfindet.
- 15 55. Verfahren nach einem der Ansprüche 53 oder 54, bei dem darüber hinaus die Intensitäten der Reflexe des Beugungsbildes ermittelt werden.
- 20 56. Verfahren nach einem der Ansprüche 53 bis 55, bei dem darüber hinaus unter Verwendung der Phaseninformation, z.B. aus isomorpher Ersetzung oder MAD (multiple anomalous scattering), die Elektronendichte der Kristallstruktur ermittelt wird.
- 25 57. Verfahren zur Identifikation von ein kristallisiertes Protein bindenden Liganden, bei dem (a) ein potentieller Ligand nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 52 auf den Kristall aufgebracht wird, (b) in einem zeitlichen Abstand von variabler Länge Beugungsintensitäten gemessen werden und (c) diese im zeitlichen Abstand gemessenen Beugungsintensitäten entsprechend ihrer zeitlichen Abfolge miteinander verglichen werden.
- 30 58. Verfahren zur röntgenkristallographischen Strukturaufklärung im Hochdurchsatz, bei dem (a) der Kristall bzw. die Kristalle, vorzugsweise frei montiert, vorgehalten werden, (b) auf die vorzugsweise frei montierten Kristalle Mikrotropfen einer bspw. mindestens einen Liganden enthaltenden Lösung aufgetragen werden, (c) die gemäß Verfahrensschritt (b) behandelten Kristalle gelagert werden und (d) die Kristalle röntgenkristallographische untersucht werden.



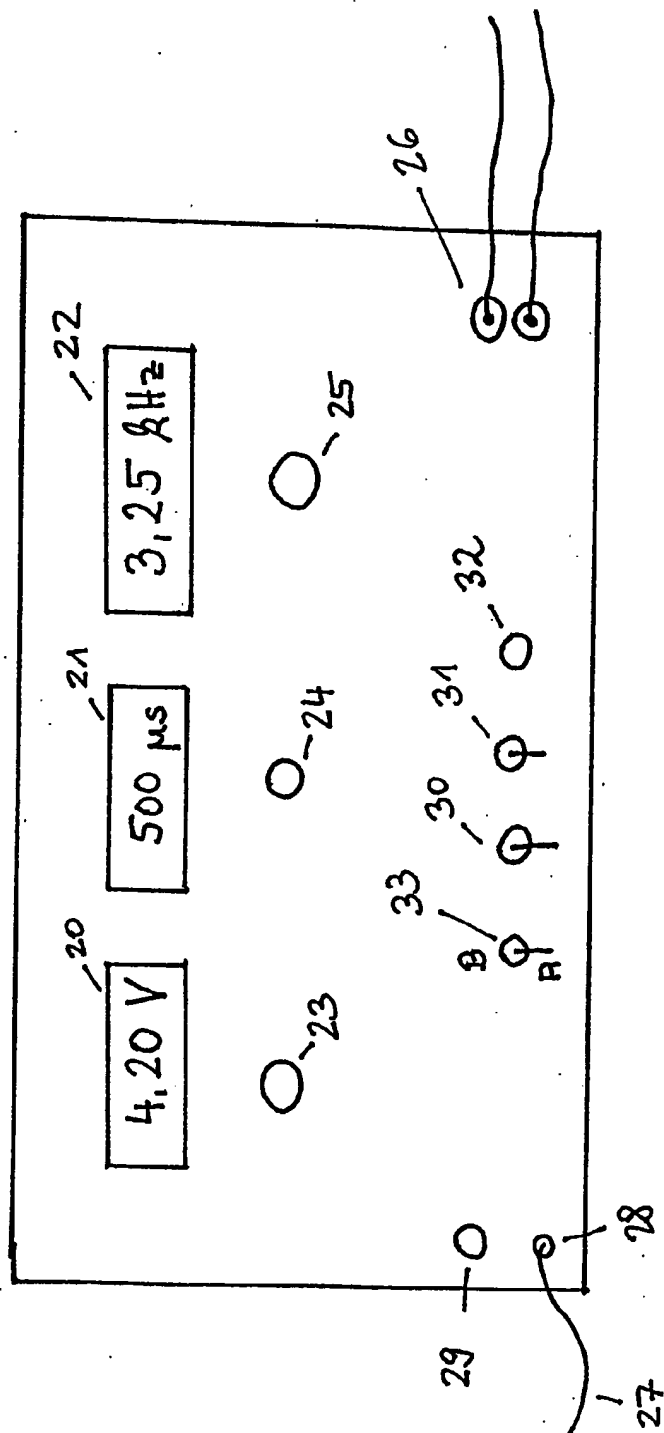


Fig. 2

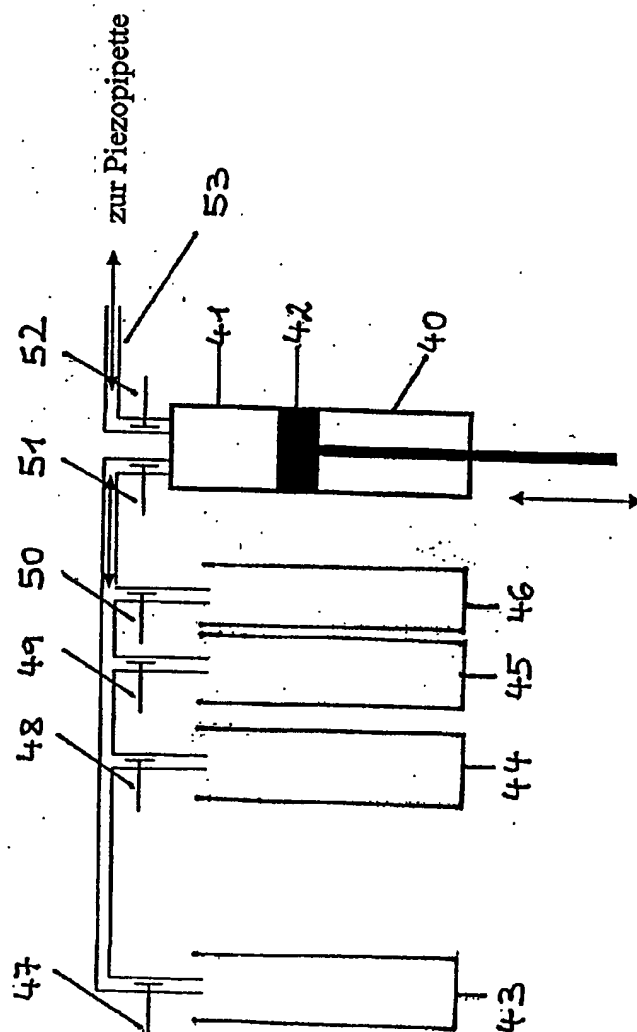


Fig. 3

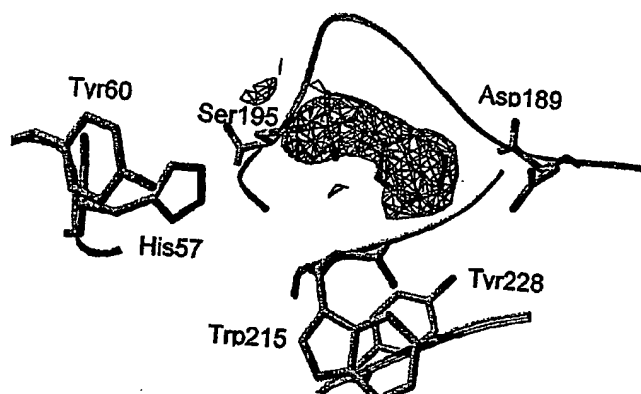


Fig. 4



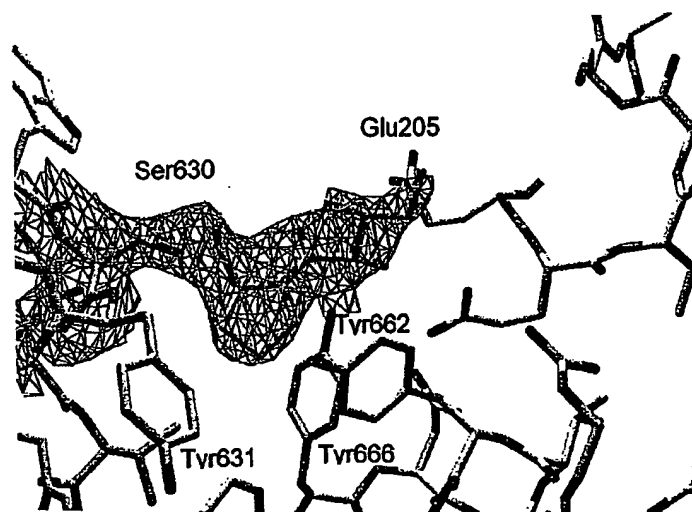


Fig. 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/008812

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C30B7/00 B01J19/00 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C30B B01J G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, INSPEC		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/191048 A1 (STEARNS RICHARD G ET AL) 19 December 2002 (2002-12-19)  paragraph '0090!; figures 2B,2C,4A,4B,4C paragraph '0132! - paragraph '0133! paragraph '0149! - paragraph '0150! paragraph '0161! paragraph '0184!	1,2, 13-30, 36,37, 43-49
X	US 2003/049642 A1 (CEDERGREN EILA ET AL) 13 March 2003 (2003-03-13)  Absatz '0116!, Sätze 1,2; figures 3,5A  ----- -/--	1,2, 13-30, 36,37, 43-49
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  4 November 2004		Date of mailing of the international search report  15/11/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Strohmayer, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/008812

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2002/153055 A1 (DOWNS ROBERT C ET AL) 24 October 2002 (2002-10-24)  paragraph '0045! paragraph '0050!	1,2, 13-30, 36,37, 43-49
X	EP 0 278 131 A (BOC GROUP PLC) 17 August 1988 (1988-08-17) column 3, line 40 - line 55; figure 1	1,32,36
X	STEWART P S ET AL: "A comparison of microbatch and vapour diffusion for initial screening of crystallization conditions" JOURNAL OF CRYSTAL GROWTH, NORTH-HOLLAND PUBLISHING CO. AMSTERDAM, NL, vol. 168, no. 1, 1 October 1996 (1996-10-01), pages 170-174, XP004013784 ISSN: 0022-0248 Seite 172, linke Spalte, die letzten beiden Sätze des Absatzes (iii)	1,36
X	CLEMONS W M ET AL: "Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from Thermus thermophilus: purification, crystallization and structure determination" JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, LONDON, GB, vol. 310, no. 4, 20 July 2001 (2001-07-20), pages 827-843, XP004480481 ISSN: 0022-2836 Seite 840, der erste Satz des Absatzes "Cryoprotection, flash cooling and screening of crystals"	1,36
A	CHAYEN N E ET AL: "Protein crystallization for genomics: towards high-throughput optimization techniques" ACTA CRYSTALLOGRAPHICA, SECTION D (BIOLOGICAL CRYSTALLOGRAPHY) MUNKSGAARD INTERNATIONAL BOOKSELLERS AND PUBLISHERS FOR INT. UNION CRYSTALLOGR DENMARK, vol. D58, 2002, pages 921-927, XP009013224 ISSN: 0907-4449 page 924 - page 926	1-58
A	DE 198 42 797 C (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 27 January 2000 (2000-01-27) cited in the application the whole document	1-58
	-/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2004/008812

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NIENABER V L ET AL: "Discovering novel ligands for macromolecules using X-ray crystallographic screening" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 18, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 1105-1108, XP002250092 ISSN: 1087-0156 figure 1	1-58
A	WO 99/45379 A (ABBOTT LAB) 10 September 1999 (1999-09-10) abstract	1-58

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/008812

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2002191048 A1	19-12-2002	US 2003048341 A1	13-03-2003
		US 2002061258 A1	23-05-2002
		EP 1352112 A1	15-10-2003
		WO 02066713 A1	29-08-2002
		AU 2433602 A	02-04-2002
		AU 9311101 A	02-04-2002
		AU 9473301 A	02-04-2002
		CA 2423063 A1	28-03-2002
		CA 2423068 A1	28-03-2002
		EP 1324823 A2	09-07-2003
		EP 1337325 A2	27-08-2003
		JP 2004518520 T	24-06-2004
		JP 2004518411 T	24-06-2004
		WO 0224323 A2	28-03-2002
		WO 0224324 A2	28-03-2002
		WO 0224325 A2	28-03-2002
		US 2003052943 A1	20-03-2003
		US 2003138852 A1	24-07-2003
		US 2004119793 A1	24-06-2004
		US 2002085063 A1	04-07-2002
		US 2002061598 A1	23-05-2002
		US 2002037579 A1	28-03-2002
		US 2002037527 A1	28-03-2002
US 2003049642 A1	13-03-2003	CA 2434886 A1	25-07-2002
		EP 1360349 A1	12-11-2003
		WO 02057520 A1	25-07-2002
US 2002153055 A1	24-10-2002	US 2002139439 A1	03-10-2002
		WO 02076830 A1	03-10-2002
EP 0278131 A	17-08-1988	EP 0278131 A1	17-08-1988
		DE 3771482 D1	22-08-1991
		GB 2183500 A ,B	10-06-1987
DE 19842797 C	27-01-2000	DE 19842797 C1	27-01-2000
		AT 219834 T	15-07-2002
		DE 59901839 D1	01-08-2002
		EP 0987543 A2	22-03-2000
		US 6355217 B1	12-03-2002
WO 9945379 A	10-09-1999	AU 2887099 A	20-09-1999
		AU 767991 B2	27-11-2003
		AU 2987899 A	20-09-1999
		BG 104802 A	30-04-2001
		BR 9908563 A	21-11-2000
		CA 2321968 A1	10-09-1999
		CN 1299467 T	13-06-2001
		EP 1068531 A2	17-01-2001
		HU 0101959 A2	28-09-2001
		JP 2002506206 T	26-02-2002
		NO 20004433 A	06-11-2000
		PL 343264 A1	30-07-2001
		SK 13242000 A3	12-03-2001
		TR 200002572 T2	21-11-2000
		TR 200101127 T2	21-06-2002
		TR 200101129 T2	21-06-2002
		TR 200101200 T2	21-02-2002

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/008812

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9945379	A	WO 9945389 A2	10-09-1999
		WO 9945379 A2	10-09-1999
		US 6297021 B1	02-10-2001

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**